

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2000316569 A

(43) Date of publication of application: 21.11.2000

(51) Int. Cl. C12N 5/08
// G01N 33/15

(21) Application number: 11239532
(22) Date of filing: 26.08.1999
(30) Priority: 07.09.1998 JP 10253109
10.03.1999 JP 11063849

(71) Applicant: SUMITOMO BAKELITE CO LTD
(72) Inventor: WATANABE YOSHIKI

**(54) CELL CULTURE AND PHARMACOLOGICAL
TEST METHOD THEREFOR**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To culture a cell and surely carry out a pharmacological test or a toxicity test using especially a neuron at any time by thawing a frozen and preserved tissue at normal temperature, dispersing the thawed tissue and then culturing the resultant tissue.

SOLUTION: A frozen and preserved tissue is thawed at 0-8°C, preferably 9-25°C, more preferably normal

temperature of 26-30°C, then dispersed with an enzyme such as trypsin and cultured to culture a cell such as a neuron or an undifferentiated neuron. Furthermore, a culture solution preferably contains a glial cell culture supernatant and the pharmacological test is preferably carried out by using the cultured neuron or the cultured undifferentiated neuron. A preserved liquid is preferably washed immediately after completing the thawing and a substance having the cytotoxicity such as dimethyl sulfoxide contained in the preserved liquid is especially preferably excluded.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-316569

(P2000-316569A)

(49) 公開日 平成12年11月21日 (2000. 11. 21)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーム(参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 6 5
# G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平11-239532	(71) 出願人	000002141 住友ベークライト株式会社 東京都品川区東品川2丁目5番8号
(22) 出願日	平成11年8月26日 (1999. 8. 26)	(72) 発明者	渡辺 芳明 秋田市土崎港相築町字中島下27-4 秋田 住友ベーク株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平10-253109	Pターム(参考)	4B065 AA90X AA91X BB01 BB23 BC01 BD32 BD33 CA44 CA45
(32) 優先日	平成10年9月7日 (1998. 9. 7)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平11-63349		
(32) 優先日	平成11年3月10日 (1999. 3. 10)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 細胞培養方法及びその薬理試験法

(57) 【要約】

【課題】 凍結保存組織を用いた細胞の培養方法を提供する。

【解決手段】 凍結保存組織を、常温で緩やかに解冻し、酵素処理を施して単離した細胞を培養する細胞培養方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 凍結保存した組織を常温で解冻し、分散後培養する細胞培養方法。

【請求項2】 常温が0～8℃である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項3】 常温が9～25℃である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項4】 常温が26～30℃である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項5】 分散方法が酵素による分散方法をとる請求項1記載の培養方法。

【請求項6】 培養される細胞が神経細胞である請求項1～5記載のいずれかの細胞培養方法。

【請求項7】 培養される細胞が神経細胞であり、その培養液がグリア細胞培養上清を含有する請求項1～5記載のいずれかの細胞培養方法。

【請求項8】 請求項6又は7記載の培養方法を用いることを特徴とする培養神経細胞を用いる薬理試験法。

【請求項9】 培養される細胞が未分化神経細胞である請求項1～5記載のいずれかの細胞培養方法。

【請求項10】 培養される細胞が未分化神経細胞であり、その培養液がグリア細胞培養上清を含有する請求項1～5記載のいずれかの細胞培養方法。

【請求項11】 請求項8又は9記載の培養方法を用いることを特徴とする未分化神経細胞を用いる薬理試験法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、凍結保存した動物の組織を用いる細胞培養方法とその薬理試験法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 組織から単離した細胞を試験、検査に用いる手法は、ライフサイエンス関連分野では欠かせない方法となっており、疾病、病態の診断、新薬の探索及び薬効の判定、あるいはまた環境汚染物質の試験、などに幅広く用いられている。単離した細胞は直ちに試験に用いる場合もあるが、多くは細胞培養の方法により培養皿や試験管のなかで培養が行われている。この培養系を用いて種々の検査が行われる。各種の細胞が試験に用いられているが、ライフサイエンス分野の研究開発が脳神経系を重点分野としてとらえるに伴い、脳神経細胞の培養系も利用される頻度が高くなってきた。

【0003】 通常脳神経組織の神経細胞を培養する場合は、組織を切りだして直ちに組織片や分散した状態にして培養を行う。直ちに培養系へ移れない場合は、冷蔵保存しておいた組織を使うこともある。しかし、冷蔵保存では、保存期間がごく短い場合のみ可能で長期間の保存はできない。特に神経組織の場合は長期間の保存では神経細胞数の減少が大きい。経時的な神経細胞死を抑える

ことができず試験検査用としては適切ではない。実用的には必要な細胞が必要なときに、いつでも、直ぐに使える形—例えば、凍結保存したものを解冻すれば直ぐに使える形—が望ましい。

【0004】 一般的に細胞の長期保存を行う場合に用いる方法は、低温下で凍結保存するものである。株化細胞では、この方法が好適で、液体窒素下で長期間の保存が行なわれている。また、この保存を行うためには通常の培養に用いる溶液ではなく専用の保存液が用いられるが、この保存液に関して各種の検討がなされている。米国特許3852155号では、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、ウシ胎児血清を栄養培地に添加する方法が、特公平5-8675号公報ではメチルセルロース、グリセリンが、特開平2-186979号公報では、ホスホグリセリド等が、特開平5-7489号公報ではトレハロース、ゼラチンが、特開平5-38284号公報では、1-ケトースが、特開平6-46840号公報ではデキストラン、グリコーゲン、ポリビニルピロリドン、グルコース、シュクロース等が、特開平6-217764号公報では、乳、ホエー画分、カゼイン画分等が、特開平7-23779号公報では、グリセロール、ポリエチレングリコールを添加した血清、アミノ酸フリーの保存液が、特開平7-99965号公報ではイヌリン型フルクタンが開示されている。これらは凍結障害をいかに低減するかを重視して行われた検討である。

【0005】 神経細胞では、単離した細胞を凍結保存した場合は、生細胞率が低く実験系を構成しづらい。このような単離細胞を凍結保存する方法の他に、組織をそのまま凍結保存する方法が用いられる場合がある。しかし、他の組織に比べ、神経組織の場合は、これを培養系に移した場合、他の組織の場合と比べ、得られる細胞数が少なく、又培養状態も不十分な場合が多い。また、解冻方法は、加温し(37℃くらいに)急速に解冻する方法が好適とされ一般的に用いられる。分散し凍結保存した細胞の解冻方法としては、最も基本の方法として用いられるが、神経組織の場合では、この方法が不十分な結果しか与えない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上記のごとく、細胞を凍結保存し、これを培養する方法として種々の検討がなされてきているが、現状では十分とは言えない。また、組織を凍結保存する場合も新鮮組織を用いた場合に比べ、得られる細胞数が少ない場合が多い。また、神経細胞の場合には、特に、通常の培養系では不十分な結果しか得られていない。本発明は、このような現状に鑑みてなされたもので、組織を凍結保存し、必要なときには随時使用可能で、安定な試験系等を構成できる培養方法を提供することを目的とするものであり、特に神経系細胞の培養に好適な培養方法を提供する。

【0007】

【課題を解決するための手段】 組織を凍結保存すること

により、その組織を構成する細胞は、必然的に何らかのダメージを受ける。本発明者らはこの影響を低減することは単なる凍結障害防止剤を考慮しただけでは不十分であることから、細胞に対する栄養因子の効果や凍結組織の解冻方法などを検討し、さらに組織からの細胞の単離や、その後の培養方法についても鋭意検討を加えた。その結果本発明の効果を見いだしたものである。

【0008】すなわち、本発明の第1の発明は凍結保存した組織を常温で解冻し、分散後培養する細胞培養方法である。また第2の発明は第1の発明の培養方法を用いることを特徴とする培養神経細胞を用いる薬理試験法である。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明に用いる組織は、特に限定されるものではないが、胎児の組織が好結果を与える場合が多い。特に神経系組織の場合は胎児組織が好ましい。小脳、海馬などは生後1週間ほどのものまで良好な結果を与える。成熟した組織でも可能であるが、全ての部位で同じような好結果を与えるものではない。また細胞種でも異なり、グリア細胞を培養する場合は、神経細胞の場合ほどの差異は少ない。本発明は主として中枢神経組織に好適であるが、末梢神経組織についても適用可能である。凍結保存液は、上記した保存液をいずれでも用いる事が可能である。特に血清とDMSOの効果が大きい。血清は10～90%をDMSOは8～12%が好適である。他に塩化カリウム20～25mM、グルコース1,000～4,500mg/ml、酢酸トコフェロール、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アスコルビン酸など種々の栄養素や栄養因子を添加するのも効果がある。

【0010】組織を切り出したら、直ちに、冷蔵保存しておいた保存液に組織を入れ、20～90分程冷蔵保存する。この際の容器は1～2ml程の凍結保存用のプラスチック容器が好適である。冷蔵処理を行った後液体窒素温度まで1℃/min程の速度で冷凍する。プログラムフリーザーと呼ばれる機器で自動的に行うことが可能である。この後の長期保存は液体窒素下に入れ保存する。また、冷蔵保存した後-80℃程の冷凍庫に3～5時間ほど冷却し、その後直ちに液体窒素下で保存する方法も好適である。

【0011】この保存組織を使用する際には、まず解冻を行う。液体窒素下に保存しておいたチューブをとりだし、常温下に静置する。冷蔵庫温度(0～8℃)、室温(9～25℃)、高気圧条件(26～30℃)が可能である。冷蔵庫温度では、解冻に時間を要するため、これ以上の温度が実用的である。この温度で緩やかな解冻を行う。この際に、解冻を早めるための撹拌などの操作はネガティブな効果しか与えない。20～60分程の時間をかけ解冻する。凍結保存細胞の使用法として標準化されている37℃温浴中での急速解冻法では、得られる細胞数が、本発明の方法に比し30～60%程度である。

【0012】解冻が終わったら直ちに、保存液の洗浄を

行う。特に保存液に含まれるDMSOなどの細胞毒性を持っているものをできるだけ、すみやかに除く。これは組織を洗浄液の中に入れ洗う、という方法を探る。この洗浄液はハンクスの平衡塩液(HBSS)などが好適であるが、特に限定されるものではない。2～5回洗浄操作を行う。この操作時には細胞の脱落を抑えながら丁寧な扱いが必要である。

【0013】洗浄が終了したら、酵素処理で細胞を分散する。この際に酵素を使わずに機能的に分散する方法も可能であるが、細胞へのダメージや、得られる培養系の均一さを比較すると、酵素法が好適である。この酵素は、通常使われるものと例えば、トリプシン、パバイン、コラゲナーゼ、ディスパーゼなど、いずれのものでも使用可能である。また、神経組織の場合は、パバインが好適である。この酵素処理を37℃で5～60分程処理し細胞を分散する。細胞へのダメージを低減させるため低温下(0～10℃程度)での処理も有効である。

【0014】得られた細胞は、各細胞に固有の培養条件により培養が可能である。神経細胞では、例えばMEM+10%FBS、DMEM+10%FBS、DMEM/F-12+5%FBSなど。また、無血清培養液では、DMFまたはDMF/F-12に(インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸)の栄養因子を添加した物、Neurobasal+B27(GIBCO-BRL社製)の培養液などがよく用いられる。しかし、神経細胞の場合は、グリア細胞と異なりこれらの培養液は効果的とは言えない場合が多く、グリア細胞の培養上清を含有する培養液が好適である。同様に、グリア細胞の培養においても、1型アストロサイトの培養は上記の血清入りの通常培養液が有効であるが、0-2Aグリア前駆細胞や2型アストロサイトを培養する場合は、グリア細胞培養上清含有培養液が適する。また本発明による方法では、グリア細胞、神経細胞に分化する神経幹細胞の培養も可能である。通常用いられるFGF、EGFの両栄養因子を加えた培養系(F.Ciccoliniらの方法(1998)J.Neurosci.18(19)7869他)で、一般的にneurosphereと称される形態で、その増殖が認められる。

【0015】また上記例に限定されることなく、無血清系でインスリン、トランスフェリン、EGF、FGF、IGF、NGF、BDNF、NT-3など、種々の栄養因子のカクテルを用いても、それぞれの細胞で有効に適用が可能で、実験に使用可能な培養系を構成できる。

【0016】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を具体的に説明する。

実施例及び比較例1、2

(組織の保存) DMEM(GIBCO-BRL社製)にFBSを20%、DMSOを10%、塩化カリウムを25mM(以上SIGMA社製)となるように加えた。この保存液はクラッシュドアイス中に使用するまで氷冷した。胎生17日のラット胎児を定法に従いとりだし、頭部を切斷、大脳を切り出した。脳膜を

除いた左右両半球を氷冷しておいた保存液1mlに1胎児分を加えた。容器は2mlのセラムチューブ（住友ベークライト製）を用いた。1時間氷冷した後-80℃の超低温冷凍庫に移した。さらに3時間後液体窒素タンクに移し冷凍保存した。

【0017】（組織の解凍） セラムチューブを液体窒素タンクから取り出し、室温（23℃）下に静置。30分後、保存液を捨て、5mlのHBSS液（SIGMA社製）を入れたチューブに移した。5分後この液を捨て、新しく5mlのHBSSを加えた。5分間静置後HBSSを除いた。比較例1として、解凍を37℃の温浴中で5分間行った。他は実施例と同様に行った。

【0018】（組織の酵素処理） HBSS溶液にパバイン30U/ml（Worthington Biochemical社製）システイン0.2mg/ml、グルコース4.5mg/ml（以上SIGMA社製）、となるように調整し1時間、37℃で加温した。HEPPSを10mM加え、pHを7.4に調整し、DNase（以上Boehringer Mannheim社製）を0.01%添加。0.22μmのフィルターで濾過し酵素液とした。解凍した組織を1個/5mlの酵素液量で15～20分間、37℃で処理した。

【0019】（培養液の調製） ウィスター系ラットの新生仔の脳から大脳を切り出した。0.25%のトリプシン/PBS溶液で20分酵素処理した。ピペッティングで組織を分散した後遠心分離し、酵素液を除いた。DMEM/F-12+10%FBS（試薬は以下SIGMA社製）の培養液で再分散し、45μmのメッシュフィルターで濾過した。大脳1個/培養液5mlの量を用いた。5ml/25cm²培養フラスコの割合で10日間培養、培養液の交換は2～3日間隔で行った。PBSで洗浄後血清を含有しないDMEM/F-12に交換した。この培養液にはアルブミン2.0mg/ml、インシュリン、トランスフェリン各10μg/ml、亜セレン酸10ng/ml、酢酸トコフェロール50μg/mlを添加した。1日培養後、培養上清を0.22μmのフィルターで濾過し、使用時まで凍結して保存した。比較例2の培養液として培養上清を含有せず、同じ添加物を含有するものを調製した。

【0020】（得られる細胞数の比較） 酵素処理後の細胞を5mlの上記培養液で分散し、細胞数をカウントしたところ、実施例1では 1.1×10^7 個、比較例1では 0.3×10^7 個であった。

【0021】（培養の効果の比較） この実施例の細胞を、上記の培養上清を含む培養液と含まない培養液（比較例2）で培養し比較した。細胞は実施例1の保存組織を用いた。細胞濃度は実施例1、比較例2の培養液を50mlに各保存チューブ1本量の細胞を分散した。ポリリジンコート24ウェルプレート（住友ベークライト製）に0.5ml/ウェルの量加え培養した。培養4日の時点でシトシンアラビノフラノシド（SIGMA社製）を10μMとなるように添加した。6日後、顕微鏡観察を行ったところ本実施例の培養液では、良好な神経突起の伸展をみた神経細胞が大多数であったが、比較例では生存を維持している神

経細胞はわずかであった。

【0022】実施例2、比較例3

（薬理試験）実施例1と同方法で、培養プレート（48ウェルプレート；コーニング・コースター社製）で細胞培養を行った。細胞は実施例1のものを用いた。なお、このプレートには、ポリリジン（SIGMA社製）100μg/mlの水溶液を200μl/ウェル加え、2時間室温に置き、コーティング処理を行った。純水で洗浄後細胞培養に使用した。比較例として（比較例3）、比較例2の培養上清を含有しない培養液を用いた。細胞液は 1.25×10^5 c/mlに調製し、200μl/ウェルを加え、培養した。培養3～5日にはシトシンアラビノフラノシドを10μM加え、2～3回/週の頻度で培養液を交換した。培養13日後、培養細胞をハンクス液（SIGMA社製）で2回リンスし、0μM、1,000μM各濃度のグルタミン酸を含むハンクス液に交換、室温で5分間静置した。ハンクス液で再度リンスした後、インシュリン、トランスフェリン各5μg/ml、亜セレン酸5ng/ml、プロゲステロン10nM、アルブミン2.5mg/ml（各SIGMA社製）を加えた高グルコースDMEM液（グルタミンフリー、SIGMA社製）に交換、18時間培養した。その後MTT（SIGMA社製）液を0.15mM加え2時間培養。培養液を捨て、DMSO（和光純薬社製）を200μl加えて攪拌した。各ウェルから150μlをサンプリングし、96ウェルプレートに移し替え、マイクロプレート用分光光度計で測定波長550nm、参照波長630nmで吸光度を測定した。各グルタミン酸条件での測定値〔吸光度（1,000μM）/吸光度（0μM）〕は、比較例では、[1.32/0.63]、実施例では[0.58/0.55]を示し、本実施例2の場合は明瞭な、毒性を示した。

【0023】実施例3

（組織の保存）DMEM（高グルコース、GIBCO-BRL社製）にFBSを50%、DMSOを8%、KCl（以上和光純薬製）を25mMとなるように凍結保存液を調製し、氷冷した。妊娠14日のラット胎児10匹から、線条体を定法により切り出した。保存液1mlを入れたセラムチューブ（住友ベークライト製）に入れ1.5時間氷冷、ついでプログラムフリーザーにより1℃/minの速度で、-80℃まで冷却した。その後は使用時まで液体窒素タンク内で保管した。

【0024】（組織の解凍・培養）液体窒素タンクから取り出したセラムチューブを室温下で30分静置し解凍した。解凍後HBSS液で2回洗浄し、酵素パバインを主成分とする神経細胞分散キット（Worthington Biochemical社製）で20分、酵素処理を行い、ピペッティングにより細胞分散液を得た。1回洗浄後、DMEM/F-12培養液をベースとし、アストログリア細胞の培養上清を含有する神経細胞用培養液（住友ベークライト製）にFGF（20ng/ml）、EGF（20ng/ml、以上SIGMA社製）を加えた培養液で 5×10^4 c/mlの細胞液を調製した。細胞培養用12ウェルプレート（住友ベークライト製）に1ml/ウェルの細胞液を加え5日間培養した。培養開始時には認められなかつ

た細胞が球状に凝集した浮遊状態のneurosphereが多数観察され、神経幹細胞が良好に培養されていることが観察された。

【0025】

【発明の効果】本発明の方法を用いることにより、凍結

保存した組織を用いて安定した培養系を構成することができる。特に、神経系細胞に効果があり、これにより、神経細胞を用いた薬理試験や毒性試験が必要なとき随時、確実にかつ安定に行うことができる。